

УДК 615.076:57.083
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-185-192>

ШИФР 03.01.06 СПЕЦИАЛЬНОСТЬ
Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)



Разработка и аттестация стандартного образца «Хлоркальциевый казеин»

С. М. Суханова*, Р. А. Волкова, Н. Е. Захарова, О. В. Фадейкина

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания тест-штамм *Clostridium novyi* 198 используется для определения ростовых свойств тиогликолевой среды при испытании иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) по показателю «Стерильность». Для сохранения культуры *C. novyi* 198 в споровой форме рекомендована специальная жидкая среда, содержащая нерастворимый хлоркальциевый казеин (ХК). В настоящее время стандартный образец, необходимый для контроля партий ХК в составе питательной среды для поддержания *C. novyi* 198, на российском рынке отсутствует. **Цель работы:** разработка и аттестация первой серии отраслевого стандартного образца (ОСО) «Хлоркальциевый казеин», предназначенного для контроля партий ХК и жидкой питательной среды с его добавлением для поддержания *C. novyi* 198 в споровой форме. **Материалы и методы:** в качестве кандидата в ОСО использовали термоденатурированный ХК, полученный химическим путем из казеина технического. Оценку качества ОСО проводили по методикам, изложенным в МУК 4.2.2316-08. Получение культуры *C. novyi* 198 в спортивном состоянии — подготовка, посев и инкубирование на среде, содержащей ОСО «Хлоркальциевый казеин», осуществляли в соответствии с разделом «Испытание на стерильность» МУК 4.2.2316-08. **Результаты:** для ОСО «Хлоркальциевый казеин» был определен перечень показателей качества: «Спорообразование» (аттестуемая характеристика), «Внешний вид», «Потеря в массе при высушивании», «Прозрачность среды». Проведена аттестация первой серии кандидата в ОСО «Хлоркальциевый казеин». Значение аттестуемой характеристики «Спорообразование» составило $(32,6 \pm 7,3) \%$, срок годности ОСО — 5 лет при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С. Разработан и утвержден комплект документации ОСО 42-28-444-2018. Жидкая среда с добавлением стандартизованного ХК (0,3 г/10 мл) обеспечивает сохранение биологических свойств рабочей культуры *C. novyi* 198 в течение не менее 12 месяцев. **Выводы:** по результатам аттестации ОСО «Хлоркальциевый казеин» соответствует предъявляемым требованиям и может быть использован в качестве образца сравнения для контроля новых партий ХК и оценки пригодности жидкой среды хранения с его добавлением. Применение ОСО «Хлоркальциевый казеин» позволяет стандартизовать и значительно упростить процедуру поддержания *C. novyi* 198 в стабильном состоянии, повысить эффективность и надежность оценки качества ИЛП по показателю «Стерильность», а также снизить затраты при использовании лиофильного высушенного штамма.

Ключевые слова: стерильность; ростовые свойства среды; термоденатурированный хлоркальциевый казеин; хранение штаммов; оценка качества; спорообразующие бактерии; отраслевой стандартный образец

Для цитирования: Суханова СМ, Волкова РА, Захарова НЕ, Фадейкина ОВ. Разработка и аттестация стандартного образца «Хлоркальциевый казеин». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):185–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-185-192>

Контактное лицо: Суханова Светлана Михайловна; SuhanovaSM@expmed.ru

Development and Certification of Calcium Chloride Casein Reference Standard

S. M. Sukhanova*, R. A. Volkova, N. E. Zakharova, O. V. Fadeikina

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

In accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th edition, *Clostridium novyi* 198 test strain is used to determine growth promoting properties of thioglycollate medium when testing sterility of immunobiological medicinal products. The preservation of *C. novyi* 198 as spores requires a special liquid medium containing insoluble calcium chloride casein (CChC). At present, there is no reference standard available on the Russian market for the quality control of CChC used as a component of the media for preservation of *C. novyi* 198. **The aim of the study** was to develop and certify the first batch of calcium chloride casein industry reference standard (IRS) for the quality control of CChC batches and liquid media containing CChC which is used to preserve *C. novyi* 198 as spores. **Materials and methods:** thermally denatured CChC which was chemically synthesized from industrial CChC was used as candidate material. The quality control was performed using the test procedures described in procedural guidelines MUK 4.2.2316-08. *C. novyi* 198 spores were obtained as described in the «Sterility testing» section of MUK 4.2.2316-08 (preparation, inoculation and incubation in the medium containing calcium chloride casein IRS). **Results:** a list of quality parameters was developed for calcium chloride casein IRS: «Spore formation» (certifiable parameter), «Appearance», «Loss on drying», «Clarity of medium». The first batch of the candidate calcium chloride casein IRS was certified. The value of the «Spore formation» certifiable parameter was found to be $(32.6 \pm 7.3) \%$, the IRS shelf life was 5 years when

stored in a dry place protected from light at a temperature of 15 to 25 °C. A documentation package for the IRS 42-28-444-2018 was prepared and approved. The liquid medium containing CChC reference material (0.3 g/10 mL) allows for preservation of the biological properties of the *C. novyi* 198 working culture for at least 12 months.

Conclusions: the certification results demonstrate that the calcium chloride casein IRS meets the applicable requirements and can be used as reference material to control the quality of new CChC batches and to assess the suitability of liquid medium containing CChC for preservation purposes. The use of the calcium chloride casein IRS makes it possible to standardise and greatly simplify the procedure for preserving the stability of *C. novyi* 198, to increase the efficiency and reliability of immunobiologicals quality control in terms of Sterility, and to reduce costs when using a freeze-dried strain.

Key words: sterility; growth promoting properties of media; thermally denaturated calcium chloride casein; strain storage; quality control; spore-forming bacteria; industry reference standard

For citation: Sukhanova SM, Volkova RA, Zakharova NE, Fadeikina OV. Development and certification of calcium chloride casein reference standard. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):185–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-185-192>

Corresponding author: Svetlana M. Sukhanova; SuhanovaSM@expmed.ru

Отсутствие контаминации, вызванной посторонними микроорганизмами — одно из основных требований к качеству иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), вводимых людям. Оценка пригодности питательных сред, используемых при проведении испытания на стерильность, с помощью чувствительных микроорганизмов является важнейшим элементом системы обеспечения качества, гарантирующим микробиологическую безопасность ИЛП. «Золотым стандартом» выявления контаминации в ИЛП служит специально разработанная схема, позволяющая использовать для испытания одну тиогликолевую среду. Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания¹ применение среды в качестве универсальной допускается при подтверждении наличия у нее ростовых свойств в отношении тест-штаммов аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов. Ростовые свойства, обеспечивающие выявление анаэробных контаминантов, в этом случае оценивают с помощью требовательного к условиям культивирования тест-штамма *Clostridium novyi* 198 (*C. novyi* 198), позволяющего четко дифференцировать партии тиогликолевой среды по их чувствительности [1–3]. *Clostridium novyi* тип С — крупная полиморфная грамположительная спорообразующая подвижная палочка — облигатный анаэроб, растет на питательных средах очень скудно и в вегетативной форме нестабильна. Для достоверной оценки качества питательной среды необходимо использовать культуру в стабильном состоянии [4, 5]. По данным различных исследователей, для длительного сохранения микробных клеток могут применяться методы, обеспечивающие существенное торможение протекающих в клетках жизненных процессов, в частности глубокое замораживание, высушивание из замороженного (лиофилизация) или жидкого состояния и высушивание на твердых носителях [6–8].

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России штамм *C. novyi* 198 хранится в лиофильно высушенном состоянии. Для поддержания восстановленного штамма необходимо через короткие промежутки времени (не позднее чем через 2 нед.) проводить пересевы на среду выращивания. Как показывает практика, при субкультивировании увеличивается риск контаминации, потери культуры и изменения ее биологических свойств. Проблема наличия достаточного количества жизнеспособной культуры со стабильными свойствами особенно актуальна при проведении мониторинга стерильности ИЛП, изготавливаемых в условиях асептических производств. Каждая партия питательной среды должна пройти оценку пригодности на культуру,

полученной в результате не более пяти пассажей. Таким образом, микробная масса из одной ампулы лиофильно высушенного тест-штамма расходуется уже в течение 1–1,5 мес. После чего требуется повторное проведение процедур по восстановлению культуры и проверка ее чистоты. Кроме этого, необходимо учитывать частичную потерю микробной массы при процедуре высушивания, а также тот факт, что рост микроорганизма после лиофилизации нередко начинается после длительной лаг-фазы, что дополнительно увеличивает время подготовительных работ [6, 7].

Культура *C. novyi* 198 помимо лиофилизации способна без пересева в течение длительного времени сохраняться в споровом состоянии, являющемся естественной формой «самоконсервации», обеспечивающей большую выживаемость бактериального организма в неблагоприятных условиях [5]. В отечественных нормативных документах для этих целей рекомендована специальная жидкая среда, содержащая водонерастворимую форму хлоркальциевого казеина (ХК). ХК в составе среды способствует формированию спор и сохранению культуры микроорганизма в нелиофилизированном анабиотическом состоянии². Хранение *C. novyi* 198 в среде такого состава позволяет продлить срок поддержания и расходования рабочей культуры, полученной из одной ампулы лиофильно высушенного тест-штамма. До 2010 г. ХК получали в качестве приложения к тест-штамму *C. novyi* 198 из коллекции микроорганизмов ГИСК им. Л. А. Тарасевича, при этом требования к его качеству не были регламентированы, а свойства не стандартизованы. В настоящее время стандартный образец этой формы казеина, необходимый для приготовления среды, пригодной для длительного хранения *C. novyi* 198, на российском рынке отсутствует, что определяет важность и значительную потребность в его разработке. Актуальность разработки отраслевого стандартного образца (ОСО) в качестве образца сравнения свойства определяется также необходимостью реализации современного подхода к проведению испытаний лекарственных средств, связанного с оценкой пригодности используемых материалов, а именно с проведением контроля новых синтезируемых партий ХК и оценкой качества среды хранения с его добавлением.

Цель работы — разработка и аттестация первой серии ОСО «Хлоркальциевый казеин», предназначенного для контроля новых партий хлоркальциевого казеина и жидкой питательной среды с его добавлением для хранения тест-штамма *C. novyi* 198 в споровой форме.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить перечень показателей качества ОСО «Хлоркальциевый казеин» и значения аттестуемых характеристик.

¹ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

² МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред.

2. Установить срок годности ОСО.

3. Провести оценку сохранения жизнеспособности и стабильности биологических свойств тест-штамма *C. novyi* 198 после хранения на среде, содержащей стандартизованный термоденатурированный хлоркальциевый казеин.

4. Разработать комплект документации на ОСО.

Материалы и методы

Материалы

В качестве кандидата в ОСО использовали термоденатурированный хлоркальциевый казеин, полученный химическим путем по методике [9] из казеина технического (ГОСТ 17626-81).

1. Набор реагентов для окраски по Граму (ТУ 9389-083-70423725-2007), ЗАО «ЭКОлаб».

2. Отраслевой стандартный образец мутности бактериальных взвесей (10 МЕ) (ОСО 42-28-85-2017), ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

3. Штамм *Clostridium novyi* 198, тип С, ГКПМ 300205 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

4. Питательные среды лабораторного приготовления в соответствии с МУК 4.2.2316-08³.

Методы

Получение культуры *C. novyi* 198 в споровом состоянии — подготовка, посев и инкубирование на среде, содержащей ОСО «Хлоркальциевый казеин», осуществляли в соответствии с разделом «Испытание на стерильность» МУК 4.2.2316-08⁴.

Значение аттестуемой характеристики ОСО «Хлоркальциевый казеин» «Спорообразование» (количество сформировавшихся спор по отношению к общему числу (не менее 100) клеток (палочек и спор) (%) тест-штамма *C. novyi* 198) определяли в окрашенных по Граму мазках по методике, изложенной в МУК 4.2.2316-08⁵. Серию кандидата в ОСО считали прошедшей аттестацию по характеристике «Спорообразование» в том случае, если при хранении тест-штамма *C. novyi* 198 в среде, содержащей испытуемый образец (0,3 г/10 мл), формировалось не менее 15% спор. Отрицательным контролем служила суспензия тест-штамма *C. novyi* 198 при хранении его в среде, не содержащей ОСО «Хлоркальциевый казеин».

Оценку кандидата в ОСО по показателю «Внешний вид» проводили визуальным методом. «Прозрачность среды» оценивали визуально сравнением с не содержащей ХК средой для получения спор, приготовленной в тех же условиях. Показатель «Потеря в массе при высушивании» определяли по методике, изложенной в МУК 4.2.2316-08.

Срок годности ОСО устанавливали на основании испытания стабильности двух опытных партий ХК, изготовленных в 1980 и 2012 гг., по аттестованной характеристике и дополнительным показателям.

Идентификацию микроорганизмов 2-го пассажа культуры, полученного согласно методике подготовки штамма, описанной в МУК 4.2.2316-08, проводили на бактериологическом автоматическом анализаторе VITEK® 2 Compact 30 в соответствии с инструкцией производителя. Результаты обсчитывали с помощью программного обеспечения VITEK® 2 System, версия 07.01.

Расчет математических параметров (среднее значение, стандартное отклонение) выполняли с использованием программного обеспечения MS Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Для определения перечня показателей качества разрабатываемого ОСО «Хлоркальциевый казеин» проведен анализ требований МУК 4.2.2316-08 к среде для получения спор («споровая» среда, среда хранения). Установлено, что среда хранения, содержащая ХК (0,3–0,5 г/10 мл), должна обеспечивать формирование не менее 5% спор тест-штамма *C. novyi* 198 и сохранять культуру без значительного уменьшения их количества при длительном (не менее 1 года) хранении. По физико-химическим свойствам с учетом общих требований, предъявляемым к жидким питательным средам⁶, добавляемый в среду ХК должен выдерживать кипячение (при регенерации среды) и стерилизацию (121 °С в течение 15 мин), а также быть водонерастворимым, сохраняя прозрачность среды в процессе хранения [10]. На основании проведенного анализа для ОСО «Хлоркальциевый казеин» определен перечень показателей качества, включающие «Внешний вид», «Потеря в массе при высушивании», «Прозрачность среды», а в качестве аттестуемой характеристики — «Спорообразование», и их предельные значения. Для выполнения поставленных задач согласно требованиям⁷ разработаны «Техническое задание на разработку и аттестацию ОСО» и «Инструкция по изготовлению и контролю ОСО «Хлоркальциевый казеин». Установленные требования к качеству ОСО «Хлоркальциевый казеин» представлены в таблице 1.

В связи с отсутствием на российском рынке сухого препарата водонерастворимого ХК ранее нами был разработан способ его получения из казеина технического [9, 11]. В работе проведена аттестация серии ХК, полученной по данной методике, в качестве кандидата в ОСО «Хлоркальциевый казеин». Определение значения аттестуемой характеристики «Спорообразование» проводили в лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток в условиях промежуточной прецизионности (внутрилабораторной воспроизводимости). В испытаниях принимали участие два оператора. Каждый оператор проанализировал по 10 образцов бактериальной суспензии, отобранных из среды, содержащей кандидат в ОСО, и из среды, не содержащей кандидат в ОСО (отрицательный контроль). Во всех испытаниях при отсутствии в среде хранения ХК формировалось меньше 1% спор. Результаты представлены в таблице 2.

Аттестованное значение характеристики «Спорообразование» для кандидата в ОСО составило $(32,6 \pm 7,3)\%$, что соответствует критерию приемлемости, принятому при разработке требований, — не менее 15% и позволяет использовать его при оценке пригодности партий «споровой» среды, приготовленной для хранения штамма, а также в качестве образца сравнения для контроля новых партий ХК. На рисунке 1 представлен внешний вид окрашенных по Граму мазков суспензии культуры *C. novyi* 198, хранившейся на среде с добавлением (центральные и субтерминальные споры, вегетативные клетки) и без добавления ХК (вегетативные клетки).

Для анализа по дополнительным показателям качества «Внешний вид», «Прозрачность среды» и «Потеря в массе при высушивании» использовали по 20 образцов кандидата в ОСО. Показатель «Внешний вид» оценивали визуально. Все образцы серии кандидата в ОСО представляли собой хлопья светло-коричневого цвета. Определение показателя «Прозрачность среды» проводили визуально в составе среды для получения спор. Среду готовили

³ МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред.

⁴ Там же.

⁵ Там же.

⁶ Там же.

⁷ Общая фармакопейная статья 1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Требования к качеству ОСО «Хлоркальциевый казеин»
Table 1. Quality requirements for Calcium chloride casein IRS

Показатель Test parameter	Метод Test method	Норма Requirements
Спорообразование Spore formation	Микроскопия Microscopy	Не менее 15 % Not less than 15 %
Внешний вид Appearance	Визуальный Visual assessment	Хлопья от светло-желтого до светло-коричневого цвета Light yellow or light brown flakes
Потеря в массе при высушивании Loss on drying	Весовой Weight method	Не более 7,0 % Not more than 7.0 %
Прозрачность среды Clarity of medium	Визуальный Visual assessment	В составе среды хранения не должен вызывать помутнения As a component of the preservation medium the IRS should not produce turbidity

Таблица 2. Результаты определения значения аттестуемой характеристики «Спорообразование» кандидата в ОСО «Хлоркальциевый казеин»
Table 2. The results of determination of the «Spore formation» certifiable parameter for the candidate Calcium chloride casein IRS

Номер образца Sample number	Номер оператора Operator number	Спорообразование (C) ^a , % Spore formation (C) ^a , %
1	1	26,7
1	2	27,3
2	1	28,4
2	2	29,9
3	1	32,8
3	2	33,0
4	1	35,0
4	2	38,4
5	1	39,1
5	2	39,8
6	1	20,4
6	2	43,6
7	1	26,5
7	2	46,5
8	1	33,3
8	2	22,3
9	1	43,8
9	2	30,5
10	1	28,7
10	2	26,7
Среднее значение, \bar{x} Mean value, \bar{x}		32,6
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S		7,3

^a Расчет спорообразования (C) проводили по формуле:

$$C = \left(\frac{n}{N} \right) \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где n — число спор в 3–5 полях зрения, N — общее число (не менее 100) клеток (палочек и спор) в 3–5 полях зрения.

^a Spore formation (C) was calculated using the formula:

$$C = \left(\frac{n}{N} \right) \cdot 100 \%, \quad (1)$$

where n — number of spores per 3–5 fields of vision, N — total number (at least 100) of cells (rods and spores) per 3–5 fields of vision.

согласно МУК 4.2.2316-08, разливали по 10 мл в пробирки, содержащие по 0,3 г ХК, и затем стерилизовали ее автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Все приготовленные образцы готовой среды были прозрачными. При соблюдении условий хранения при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 месяцев прозрачность среды сохранялась. Образцы ХК в составе среды хранения не вызывали помутнения (рис. 2).

Анализ качества кандидата в ОСО по показателю «Потеря в массе при высушивании» проводили по методике, изложенной в МУК 4.2.2316-08. Среднее значение показателя «Потеря в массе при высушивании» для всех образцов составило (5,5 ± 0,1) %. Установление срока годности ОСО проводили на осно-

вании данных изучения стабильности серий ХК, изготовленных в 1980 и 2012 гг. — серии № 1 и № 2 соответственно. Условия их хранения соответствовали требованиям, предъявляемым к хранению большинства сухих питательных сред: в сухом защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С. Более 30 лет ХК (серия № 1) использовали для поддержания рабочей культуры тест-штамма *C. novyi* 198 в ГИСК им. Л. А. Тарасевича и на предприятиях — производителях медицинских иммунобиологических препаратов. Серию ХК № 2 применяли в текущей аналитической и экспертной работе лаборатории свыше 6 лет. Результаты испытаний серий № 1 и № 2 ХК по показателям «Спорообразование», «Внешний вид», «Потеря в массе при высуши-

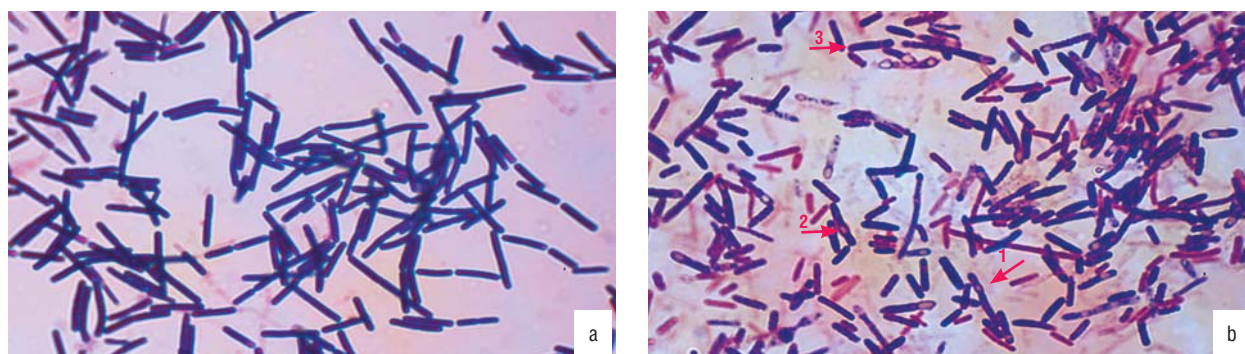


Рис. 1. *Clostridium novyi* 198: а — на среде хранения, не содержащей кандидат в ОСО, вегетативные клетки; б — на среде хранения, содержащей кандидат в ОСО «Хлоркальциевый казеин», центральные (1) и субтерминальные споры (2), вегетативные клетки (3). Увеличение $\times 1000$ (окрашивание по Граму).

Fig. 1. *Clostridium novyi* 198 strain: а — in the preservation medium that does not contain the candidate IRS, vegetative cells; б — in the preservation medium containing the candidate Calcium chloride casein IRS, central (1) and subterminal spores (2), vegetative cells (3). Magnification $1000\times$ (Gram staining).

вании» и «Прозрачность среды» с 2012 по 2018 г. представлены в таблице 3. На протяжении всего периода хранения обе серии ХК сохраняли внешний вид хлопьев светло-коричневого и светло-желтого цвета соответственно, а партии приготовленной среды хранения, содержащие образцы ХК, были прозрачными. Значение аттестованной характеристики «Спорообразование» для серии № 1 — $(77,6 \pm 4,2)\%$, для серии № 2 — $(40,4 \pm 4,5)\%$. Потеря в массе при высушивании составила в среднем $(5,1 \pm 2,7)\%$ и $(4,1 \pm 2,2)\%$ соответственно.

Анализ результатов по применению и стабильности свойств свидетельствует, что ХК при хранении в течение не менее 6 лет в сухом защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С сохраняет свои характеристики в пределах установленных при разработке ОСО требований, что позволяет установить срок годности для ОСО «Хлоркальциевый казеин» 5 лет.

Изучение стабильности формирования спор проводили на культуре *C. novyi* 198, хранившейся на среде, содержащей ХК, в течение четырех циклов (пассажей) продолжительностью по три месяца. По окончании каждого цикла определяли значение характеристики «Спорообразование». Полученные значения данного показателя при хранении тест-штамма *C. novyi* 198 в споровой среде представлены в таблице 4.

При хранении в течение 15 месяцев тест-штамма *C. novyi* 198 на жидкой среде, содержащей ХК, формировалось от $(28,3 \pm 5,4)$ до $(31,0 \pm 3,6)\%$ спор. Сохранение биохимических свойств подтверждали, используя второй пассаж культуры *C. novyi* 198, полученной в соответствии с методикой⁸ на бактериологическом автоматическом анализаторе после каждого восстановления из спорного состояния. Восстановленная из спорного состояния культура штамма *Cl. novyi* 198 сохраняла свою жизнеспособность, культуральные и биохимические свойства. Аналогичным образом ХК серий № 1 и № 2 более 30 и 6 лет соответственно использовали в составе жидкой среды хранения для поддержания культуры штамма до IV пассажа и оценки ростовых свойств тиогликолевой среды.

Результаты анализа подтверждают, что жидкая среда, содержащая полученный по нашей методике ХК, обеспечивает формирование не менее 15% эндоспор и сохраняет биологические свойства культуры тест-штамма *C. novyi* 198 в течение не менее 15 месяцев при условии пересева 1 раз в три месяца. На основании полученных данных, а также опыта применения ХК установлен срок хранения тест-штамма *C. novyi* 198 на среде, содержащей стандартизованный ХК, при температуре

от 2 до 8 °С — 12 месяцев. Среда хранения, содержащая нерастворимую термоденатурированную форму ХК, обладает прозрачностью и позволяет формировать максимальное количество спор с последующим обратимым восстановлением свойств культуры *C. novyi* 198. Соблюдение такой схемы посева позво-

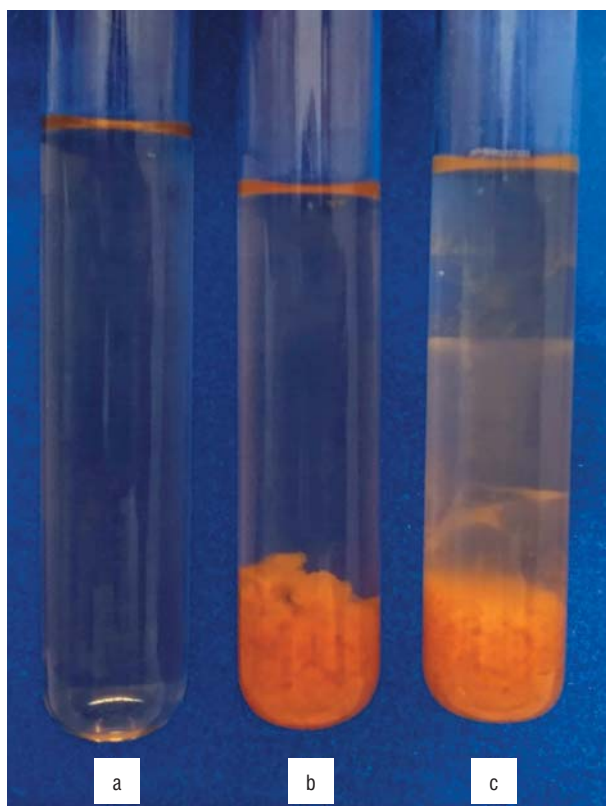


Рис. 2. Среда для получения спор: а — не содержащая кандидат в ОСО «Хлоркальциевый казеин»; б — содержащая кандидат в ОСО «Хлоркальциевый казеин»; в — штамм *Clostridium novyi* 198 на среде хранения, содержащей кандидат в ОСО «Хлоркальциевый казеин».

Fig. 2. Medium for obtaining spores: а — not containing the candidate Calcium chloride casein IRS; б — containing the candidate Calcium chloride casein IRS; в — *Clostridium novyi* 198 strain in the preservation medium containing the candidate Calcium chloride casein IRS.

⁸ МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред.

Таблица 3. Результаты изучения стабильности показателей качества хлоркальциевого казеина серий № 1 и № 2 за период с 2012 по 2018 г.

Table 3. The results of stability testing of quality parameters of calcium chloride casein batches 1 and 2 for the period from 2012 to 2018

Срок хранения, мес. Storage period, months	Показатель Test parameter			
	Серия ХК № 1 (1980 г.) ^{a, b} CChC Batch No. 1 (1980) ^{a, b}		Серия ХК № 2 (2012 г.) ^{a, c} CChC Batch No. 2 (2012) ^{a, c}	
	Спорообразование, % Spore formation, %	Потеря в массе при высушивании, % Loss on drying, %	Спорообразование, % Spore formation, %	Потеря в массе при высушивании, % Loss on drying, %
0	78,8 ± 3,8	3,4 ± 1,3	39,4 ± 4,9	3,0 ± 1,4
3	76,4 ± 4,1	2,6 ± 1,3	42,6 ± 3,1	3,4 ± 1,0
6	81,1 ± 2,3	3,3 ± 0,9	38,7 ± 4,0	2,1 ± 0,9
9	77,7 ± 4,7	3,2 ± 1,5	39,7 ± 4,5	2,8 ± 1,3
12	78,7 ± 5,0	3,5 ± 1,1	41,3 ± 3,9	3,1 ± 1,6
18	77,7 ± 5,1	3,3 ± 1,6	41,2 ± 4,1	3,3 ± 1,4
24	77,9 ± 4,1	3,2 ± 1,4	37,5 ± 4,4	3,1 ± 1,3
36	76,7 ± 2,8	3,2 ± 1,6	39,7 ± 5,3	2,9 ± 1,3
48	75,5 ± 4,0	2,9 ± 1,1	40,6 ± 4,7	3,2 ± 1,6
60 (5 лет) 60 (5 years)	75,0 ± 3,5	2,9 ± 0,9	38,6 ± 3,9	3,3 ± 1,1
72 (6 лет) 72 (6 years)	74,8 ± 2,0	2,6 ± 0,9	42,4 ± 5,0	3,4 ± 0,7
Среднее значение Mean value	77,3 ± 4,1	3,1 ± 1,2	40,2 ± 4,5	3,0 ± 1,3

Примечание. При отсутствии в среде хранения хлоркальциевого казеина (ХК) (отрицательный контроль) формировалось менее 1 % спор.

^a По показателю «Прозрачность среды» в составе среды хранения не вызывает помутнения.

^b По показателю «Внешний вид» хлопья светло-коричневого цвета.

^c По показателю «Внешний вид» хлопья светло-желтого цвета.

Note. The preservation medium which did not contain calcium chloride casein (CChC) (negative control) demonstrated less than 1 % of spores.

^a When used as a component of the preservation medium did not produce turbidity in the «Clarity of medium» test.

^b Produced light brown flakes when testing «Appearance».

^c Produced light yellow flakes when testing «Appearance».

ляет создать рабочий банк стабильной культуры и использовать его при испытании ИЛП по показателю «Стерильность».

ОСО «Хлоркальциевый казеин» применяется в настоящее время в лаборатории для оценки пригодности партий «споровой» среды для хранения штамма, а также в качестве образца сравнения для контроля вновь синтезированных партий ХК. Для хранения штамма согласно требованиям⁹ используются партии среды, позволяющие формировать не менее 5 % спор. Для вновь синтезируемых партий ХК критерий приемлемости по показателю «Спорообразование», принятый при разработке ОСО, составляет не менее 15 %. На сегодняшний день проведен контроль 43 партий тиогликолевой среды с использованием тест-штамма *C. novyi* 198, хранившегося в жидкой споровой среде. При экспертизе качества с помощью партий тиогликолевой среды с подтвержденными ростовыми свойствами в отношении данного тест-штамма с 2016 по 2019 гг. было выявлено 14 серий ИЛП, не соответствующих требованиям испытания на «Стерильность»¹⁰.

На ОСО «Хлоркальциевый казеин» разработан комплект документации: паспорт, макеты этикеток первичной и вторичной упаковок и инструкция по применению ОСО.

Таким образом, ОСО «Хлоркальциевый казеин» может быть использован в качестве образца сравнения для аттестации вновь изготовленных партий ХК, а также для определения пригодности среды хранения с его добавлением. Использование стандартизованного ХК в составе среды позволяет сохранять тест-штамм *C. novyi* 198 в нелиофилизированном виде. Полученные для ОСО

значения по аттестованной характеристике «Спорообразование» обеспечивают формирование не менее 15 % спор тест-штамма *C. novyi* 198, достаточное для поддержания рабочей культуры в течение не менее 12 месяцев. Применение ОСО «Хлоркальциевый казеин» позволяет значительно упростить процедуру поддержания *C. novyi* 198 в стабильном состоянии, повысить эффективность и надежность оценки качества ИЛП по показателю «Стерильность», а также снизить затраты при использовании лиофильно высушенного штамма.

Выводы

1. Определен перечень показателей качества ОСО «Хлоркальциевый казеин», предназначенного для контроля новых серий хлоркальциевого казеина и жидкой питательной среды с его добавлением для хранения тест-штамма *C. novyi* 198 в споровой форме: «Спорообразование» (аттестуемая характеристика), «Внешний вид», «Потеря в массе при высушивании» и «Прозрачность среды».

2. Проведена аттестация первой серии кандидата в ОСО «Хлоркальциевый казеин». Значение аттестованной характеристики составило (32,6 ± 7,3) %. Внешний вид представлял собой хлопья светло-коричневого цвета, «Потеря в массе при высушивании» составила (5,5 ± 0,1) %. Все приготовленные образцы готовой среды были прозрачными.

3. На основании данных по оценке стабильности свойств хлоркальциевого казеина установлен срок годности ОСО —

⁹ Там же.

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 4. Результаты изучения стабильности показателя «Спорообразование» кандидата в ОСО при длительном хранении *C. novyi* 198 на жидкой среде

Table 4. The results of stability testing of the «Spore formation» property of the candidate IRS during long-term storage of *C. novyi* 198 in a liquid medium

№ п/п	Спорообразование, % Spore formation, %				
	I пассаж (3 мес.) Passage I (3 months)	II пассаж (6 мес.) Passage II (6 months)	III пассаж (9 мес.) Passage III (9 months)	IV пассаж (12 мес.) Passage IV (12 months)	IV пассаж (15 мес.) Passage IV (15 months)
1	32,8	27,3	35,7	24,0	39,3
2	32,1	32,1	30,0	26,8	35,3
3	29,1	34,9	21,1	21,6	21,2
4	31,9	31,8	17,2	31,3	20,5
5	29,2	28,6	31,3	27,8	30,0
6	29,4	26,7	35,0	20,1	20,1
7	31,2	33,1	29,0	27,7	33,4
8	29,7	35,0	37,9	29,6	41,2
9	30,1	37,1	31,7	30,7	38,1
10	33,6	30,4	24,7	27,0	25,8
11	26,2	35,9	34,3	22,5	41,4
12	31,5	31,1	28,0	40,9	21,3
13	32,5	35,9	26,2	37,1	26,3
14	30,0	30,6	25,9	37,2	20,8
15	33,5	28,7	24,2	34,5	24,3
16	28,1	27,7	26,0	36,8	35,5
17	29,0	27,8	22,2	32,4	33,4
18	33,1	25,9	32,4	22,0	36,9
19	30,1	33,7	22,7	33,0	28,1
20	31,5	26,4	30,0	27,2	22,3
\bar{x}	30,7	31,0	28,3	29,5	29,8
S	2,0	3,6	5,4	5,9	7,6

Примечание. \bar{x} — среднее значение; S — стандартное отклонение.

Note. \bar{x} — mean value; S — standard deviation.

5 лет при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С.

4. Показано, что культура тест-штамма *C. novyi* 198 сохраняет жизнеспособность и стабильность биологических свойств на жидкой среде, содержащей стандартизованный хлоркальцевый казеин, в течение не менее 12 месяцев.

5. Разработан и утвержден комплект документации на ОСО 42-28-444-2018: паспорт, Инструкция по применению ОСО, макеты этикеток первичной и вторичной упаковок.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных на-

учных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

- Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo Tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]
- Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Захарова НЕ, Меркулов ВА. Испытание на стерильность иммунобиологи-

- ческих лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):5–15. [Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zakharova NE, Merkulov VA. Sterility testing of immunobiological medicinal products in Russia. Historical background and current requirements. *BIO-preparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):5–15 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15>
- Гавристова ИА, Андреева ЗМ, Бендас ЛГ. Способ контроля качества тиогликолевой среды. Авторское свидетельство № 990808; 1981. [Gavristova IA, Andreeva ZM, Bendas LG. Method of thioglycollate medium quality control. Inventor's certificate No. 990808; 1981 (In Russ.)]
- Sasaki Y, Takikawa N, Kojima A, Norimatsu M, Suzuki S, Tamura Y. Phylogenetic positions of *Clostridium novyi* and

- Clostridium haemolyticum* based on 16S rDNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(3):901–4. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-901>
5. Rainey FA, Hollen BJ, Small A. *Clostridium*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. Volume 3: The Firmicutes*. Springer; 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
 6. Похиленко ВД, Баранов АМ, Детушев КВ. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2009;4(12):99–121. [Pokhilenco VD, Baranov AM, Detushev KV. Methods for long-term storage of collection microbial cultures and tendencies of development. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki = University proceedings. Volga region. Medical sciences*. 2009;4(12):99–121 (In Russ.)]
 7. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods*. 2006;66(2):183–93. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
 8. Волков ВЯ. К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах стабильности микроорганизмов к замораживанию и высушиванию. *Микробиология*. 1994;63(1):5–16. [Volkov VYa. To the question of physiological and physico-chemical mechanisms of stability of micro-organisms to freezing and drying. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 1994;63(1):5–16 (In Russ.)]
 9. Голубенко ИА, Суханова СМ, Захарова НЕ. Способ получения хлоркальциевого казеина. Патент Российской Федерации № 2528978; 2014. [Golubenko IA, Sukhanova SM, Zakharova NE. Method of production of casein calcium chloride. Patent of the Russian Federation No. 2528978; 2014 (In Russ.)]
 10. Суханова СМ, Захарова НЕ. Питательные среды в практике микробиологических исследований. В кн.: *Руководство по медицинской микробиологии*. М.: Бином; 2008. С. 221–54. [Sukhanova SM, Zakharova NE. Nutrient media in the practice of microbiological research. In: *Guide to Medical Microbiology*. Moscow: Binom; 2008. P. 221–54 (In Russ.)]
 11. Суханова СМ, Голубенко ИА, Захарова НЕ. Исследование различных форм казеина как спорообразующего компонента среды хранения для *Clostridium novyi*. В кн.: *Тезисы всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней»*. М.; 2010. С. 108. [Sukhanova SM, Golubenko IA, Zakharova NE. Study of various forms of casein as a pore-forming component of the storage medium for *Clostridium novyi*. In: *Proceedings of the all-Russian scientific-practical conference «Vaccinology 2010. Improving the immunobiological means of prevention, diagnosis and treatment of infectious diseases»*. Moscow; 2010. P. 108 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук. *Svetlana M. Sukhanova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук. *Rausa A. Volkova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Захарова Наталия Евгеньевна, канд. биол. наук. *Natalia E. Zakharova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0985-3694>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук. *Olga V. Fadeikina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Поступила 03.06.2019

После доработки 02.08.2019

Принята к публикации 26.08.2019

Received 3 June 2019

Revised 2 August 2019

Accepted 26 August 2019